

ВЫБОР МЕТОДА ОЧИСТКИ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ КЛАССА G ДЛЯ ОЦЕНКИ ИХ АБЗИМНОЙ АКТИВНОСТИ

*Генералова А.Г., Моисеева А.М., Железняк Н.В., Жерулик С.В., Генералов И.И.
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Введение. Одним из наиболее существенных технических вопросов, возникающих при исследовании абзимной активности, является чистота получаемых препаратов абзимов, так как возможное наличие активных примесей ферментов даже в минимальном количестве в препарате иммуноглобулинов (ИГ) приведет к значительному искажению результатов и их неправильной интерпретации. В настоящее время для оценки абзимной активности применяется целый набор методов. Наиболее распространенным способом очистки ИГ от примесей в этом случае является сочетание аффинной протеин А- или G-хроматографии со вспомогательными методами (высаливанием, диализом и т.п.) Г.А. Невинский с соавт. в своих исследованиях применяют многостадийную систему очистки, включающую наряду с аффинной хроматографией эксклюзионную хроматографию ИГ в диссоциирующих условиях, а также аффинную очистку АТ на антигене-субстрате (белке, ДНК или РНК, различных гаптенах). Однако эти же авторы указывают, что на стадии аффинной очистки на

протеине А степень чистоты препарата IgG уже является достаточной для достоверной оценки абзимной активности [2].

Нами ранее был разработан собственный риванол-аффинно-хроматографический метод получения препаратов IgG для оценки их каталитической активности [1]. В настоящем исследовании мы продолжили усовершенствование данного способа.

Целью исследования стала разработка комбинированной методики получения высокоочищенных препаратов IgG с увеличением их выхода из малых объемов сыворотки.

Материалы и методы. В качестве материала для получения IgG использовали пулированную сыворотку (свыше 20 образцов) больных ревматологическими заболеваниями с высокой концентрацией IgG (более 15 мг/мл по данным иммуноферментного анализа, тест-система ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Исходная схема очистки IgG на первом этапе включает переосаждение сыворотки 0,75% раствором риванола в соотношении 1:2 с последующей обработкой препарата на колонке с активированным углем. Использование риванола обеспечивает удаление альбумина, а также альфа- и бета-глобулинов. Полученный после этого препарат подвергали аффинной хроматографии, пропуская его через колонку с агарозой, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка, уравновешенную 0,1М фосфатным буфером со скоростью ~ 0,5 мл в минуту. После этого колонку последовательно промывали 0,1М фосфатным буфером pH 7,4 с 1% раствором тритона X-305, а затем без детергента в количестве 5-6 объемов колонки до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся иммуноглобулинов класса G (G1, G2, G4) вели 0,1М глицин-HCl буфером pH 2,8 до исчезновения белка в элюенте (отбирали отдельно фракции по 1-1,5 мл). Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяли. Пробы немедленно нейтрализовали 1М глицин-HCl буфером pH 9,0. Концентрацию белка в препаратах определяли спектрофотометрически на длине волны 280 нм или по методу Бредфорд. Хранили препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках в морозильнике при -20°C.

Исходя из полученных предварительных данных, суммарный выход IgG при очистке таким способом снижается при уменьшении исходного объема сыворотки. В некоторых случаях это является критичным, в частности, при оценке абзимной активности у больных детей, где объем сыворотки для взятия ограничен 1-2 мл. Отсюда для выделения IgG из малых объемов сыворотки нами была разработана новая модификация базового способа очистки. Исходный метод для очистки IgG из 1 мл сыворотки был модифицирован следующим образом: (1) концентрация риванола была увеличена вдвое с одновременным двукратным снижением его объема; (2) вместо удаления риванола с помощью активированного угля использовали препаративную гель-фильтрацию образца на колонке с мелкопористым декстраном Молселектом Г10; во время гель-фильтрации удаляли риванол и низкомолекулярные примеси. Дальнейший ход выделения не отличался от вышеописанного.

В качестве еще одного метода сравнения нами применялся комбинированный метод очистки абзимных IgG, включающий двукратную

преципитацию ИГ из 1 мл сыворотки сульфатом аммония с последующей аффинной хроматографией на матрице с протеином А.

Качественное определение ИГ различных классов в образцах проводили иммунодиффузией по Оухтерлони. Степень чистоты полученных препаратов оценивали электрофорезом в 12,5% и градиентном 7,5-20% полиакриламидном геле (ПАГ) с додецилсульфатом натрия.

Результаты и обсуждение. По итогам сопоставления различных методов очистки было обнаружено, что наибольшие потери белка (в том числе IgG) наблюдаются при обработке препарата активированным углем. В свою очередь, гель-фильтрация на Молселекте Г10 не приводила к значительным потерям ИГ при полном удалении риванола. Модифицированный метод позволяет выделять до 9 мг IgG из 1 мл сыворотки (выход 50-60%). Для сравнения в базовом варианте способа было получено ~ 3,5 мг IgG (выход – менее 25%), при этом препарат оказался разбавленным более чем в 3 раза.

Метод с переосаждением сульфатом аммония и аффинной хроматографией также уступал разработанной нами модификации (выход IgG был ниже в 1,5-2 раза). Кроме того, возникли существенные трудности при растворении препарата IgG после солевой преципитации. Это потребовало дополнительной фильтрации пробы через нитроцеллюлозные фильтры.

Методы иммунохимического анализа и электрофорез в ПАГ подтвердили гомогенность препаратов IgG, полученных в результате всех методов очистки, что свидетельствует об их пригодности для последующей оценки абзимной активности.

В целом разработанная нами модификация выделения IgG оказалась оптимальной как по степени чистоты препаратов ИГ, так и по их количеству.

Выводы.

Разработан способ, позволяющий получать иммунохимически и электрофоретически гомогенные препараты IgG с выходом ~ 50% из небольших (0,5-1 мл) объемов сыворотки. Полученные препараты могут быть использованы в дальнейшем для оценки их абзимной активности.

Литература:

1. Пат. С1 ВУ, МПК 6G01N 33/48. Способ очистки иммуноглобулинов класса G из сыворотки крови и устройство для аффинной хроматографии/ Конорев М.Р., Генералов И.И., Козловский И.В. и др. –N3205, Заявл. 05.02.1996, Оpubл. 30.12.1999// Афицыйны бюлетэнь Дзярж. пат. ведамства Рэсп. Беларусь –1999 –№4.
2. Nevinsky G.A., Favorova O.O., Buneva V.N. Catalytic antibodies: new characters in protein repertoire //Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual. – Cold Spring Harbor. Lab Press, 2002. – P.523-534